

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Mike FARWICK et al

SERIAL NO: NEW APPLICATION

FILED: HEREWITH

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE SAHH GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS

WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number 60,294,277, filed May 31, 2001, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	DE 100 44 706.6	September 9, 2000
GERMANY	DE 101 09 685.2	February 28, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

*Corwin Paul Umbach*  
CORWIN PAUL UMBACH Reg. No. 40,211

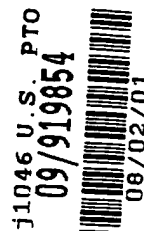
Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Robert W. Hahl  
Registration No. 33,893



22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)



#10  
A.Q.  
2/26/03



J1046 U.S. PTO  
09/919854



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 44 706.6

**Anmeldetag:** 9. September 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

**IPC:** C 12 N, C 12 Q, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 12. Juni 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Weihmayr

## Neue für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das sahH-Gen  
5 verstärkt wird.

### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie,  
10 in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der  
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die  
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und  
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

## 5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

### Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt sind L-Lysin und L-Methionin.

- Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. 20 Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

- 25 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sahH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das 30 die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 5 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- 10 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Adenosylhomocysteinase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 15 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 20 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

- 25 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2  
dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,  
5 insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und  
coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in  
denen das sahH-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im  
wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die  
10 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung  
einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,  
die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit  
einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen  
Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon  
15 enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung  
enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA  
und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise  
Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die  
20 für die Adenosylhomocysteinase kodieren, oder um solche  
Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu  
isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der  
des sahH-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung  
25 enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren  
Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen  
hergestellt werden kann, die für die Adenosylhomocysteinase  
kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide,  
30 enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz  
besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende  
Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit  
einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es  
5 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu  
10 wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine,  
15 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Adenosylhomocysteinase und auch  
20 solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur  
25 fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-  
30 Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sahH-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise  
 5 die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden  
 10 Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung  
 15 *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind  
 20 besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
 25 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende  
 30 Mutanten bzw. Stämme.

Das neue, für das Enzym Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1.) kodierende sahH-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.



Zur Isolierung des sahH-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.

Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten

- 5 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (*Molecular and General Genetics*, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, 15 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, *Nucleic Acids Research* 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (*Molecular Microbiology* 6(3), 317-326)

- 20 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, *Gene* 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, *Life Sciences*,

- 25 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, *Gene*, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (*Proceedings of the* 30 *National Academy of Sciences USA*, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es 35 z.B. bei Sanger et al. (*Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von  
 5 Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen sahH kodierende DNA-Sequenz von C.  
 10 glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende  
 15 Aminosäuresequenz des sahH-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID  
 20 No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner  
 25 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann  
 30 unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der  
 35 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die

sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

- 10 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.
- 15 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70%
- 20 identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ
- 25 niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C
- 30 eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise

durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine

5 Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von

10 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche

15 Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide

20 synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sahH-Gens in verbesserter Weise

25 Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des

30 Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu

steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.

Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die  
 5 Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht  
 10 werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns  
 15 et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of  
 20 Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides  
 25 (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sahH-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in  
 30 coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den  
 35 kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere

Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4  
(US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS  
Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1  
(US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise  
5 verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe  
derer man das Verfahren der Genamplifikation durch  
Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es  
beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and  
10 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur  
Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons  
beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige  
Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt  
(typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum*  
15 replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise  
pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)),  
pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73  
(1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA),  
pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry  
20 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma  
Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal  
of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf  
et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder  
pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der  
25 Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird  
anschließend durch Konjugation oder Transformation in den  
gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode  
der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al.  
(Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))  
30 beschrieben. Methoden zur Transformation sind  
beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology  
and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan  
(Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS  
Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.  
35 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-

Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem sahH-Gen eines oder mehrere

- 5 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.
- 10 So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sahH-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe
  - das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
  - 15 ◦ das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
  - das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
  - 20 ◦ das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
  - das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
  - das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-25 198 31 609),
  - das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
  - das für eine feed-back resistente Aspartatkinase
  - 30 kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),

- das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE* (DE-A-195 48 222),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom* (EP-A 0131171),
- 5 • das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)* (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- 10 • das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
- 15 • das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *sahH*-Gens
- 20 eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
  - das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
  - 25 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),



- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sahH*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische

Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,

- 5 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 10 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum
- 15 notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines
- 20 einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

- Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure
- 25 oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B.
- 30 Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die
- 35 Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des

gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem  
 5 Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so  
 wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958),  
 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit  
 anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie  
 kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei  
 10 Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174)  
 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen  
 Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von  
 15 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie  
 alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische  
 Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.  
 (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring  
 20 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)  
 durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia  
 coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-  
 Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al.  
 25 entnommen werden.

### Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus  
 Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032  
 30 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)  
 beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI

- (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
- 5 Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
- Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
- 10 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.
- 15 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
- 20 DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
- 25 Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.
- Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
- 30 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin
- 35 ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

## Beispiel 2

### Isolierung und Sequenzierung des sahH-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1497 Basenpaaren, welches als sahH-Gen bezeichnet wurde. Das sahH-Gen kodiert für ein Protein von 498 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000493 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1939

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (227)..(1720)

&lt;223&gt; sahH-Gen

25

&lt;400&gt; 1

tcgcggccat catgtttggc gctccatatt ctgcggggcca ggtgctggag aattacccat 60

ttatccgcga actcgtcggg gagggctctg aagctcttcg cgggtgctgca gcgcagggtt 120

30

tggaagaggc agatgtggaa tatgacctcg aagcttattt agaggccctc aactagccct 180

ccactaaaca gttcaatca attcgggtgtc cactccaaca tgtaga gtg gtg cgc 235  
Met Val Arg

35

1

gtt aaa aaa gtt ttc cta att ttc att ttc tta aaa gga gct cgc cag 283  
Val Lys Lys Val Phe Leu Ile Phe Ile Phe Leu Lys Gly Ala Arg Gln

40

5

10

15

gac atg gca cag gtt atg gac ttc aag gtt gcc gat ctt tca cta gca 331  
Asp Met Ala Gln Val Met Asp Phe Lys Val Ala Asp Leu Ser Leu Ala  
20 25 30 35

45

gag gca gga cgt cac cag att cgt ctt gca gag tat gag atg cca ggt 379  
Glu Ala Gly Arg His Gln Ile Arg Leu Ala Glu Tyr Glu Met Pro Gly  
40 45 50

50

ctc atg cag ttg cgc aag gaa ttc gca gac gag cag cct ttg aag ggc 427  
Leu Met Gln Leu Arg Lys Glu Phe Ala Asp Glu Gln Pro Leu Lys Gly  
55 60 65

55

gcc cga att gct ggt tct atc cac atg acg gtc cag acc gcc gtg ctt 475  
Ala Arg Ile Ala Gly Ser Ile His Met Thr Val Gln Thr Ala Val Leu  
70 75 80att gag acc ctc act gct ttg ggc gct gag gtt cgt tgg gct tcc tgc 523  
Ile Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu Val Arg Trp Ala Ser Cys  
85 90 95

	aac att ttc tcc acc cag gat gag gct gca gcg gct atc gtt gtc ggc	571
	Asn Ile Phe Ser Thr Gln Asp Glu Ala Ala Ala Ile Val Val Gly	
	100 105 110 115	
5	tcc ggc acc gtc gaa gag cca gct ggt gtt cca gta ttc gcg tgg aag	619
	Ser Gly Thr Val Glu Glu Pro Ala Gly Val Pro Val Phe Ala Trp Lys	
	120 125 130	
10	ggt gag tca ctg gag gag tac tgg tgg tgc atc aac cag atc ttc agc	667
	Gly Glu Ser Leu Glu Glu Tyr Trp Trp Cys Ile Asn Gln Ile Phe Ser	
	135 140 145	
15	tgg ggc gat gag ctg cca aac atg atc ctc gac gac ggc ggt gac gcc	715
	Trp Gly Asp Glu Leu Pro Asn Met Ile Leu Asp Asp Gly Gly Asp Ala	
	150 155 160	
20	acc atg gct gtt att cgc ggt cgc gaa tac gag cag gct ggt ctg gtt	763
	Thr Met Ala Val Ile Arg Gly Arg Glu Tyr Glu Gln Ala Gly Leu Val	
	165 170 175	
	cca cca gca gag gcc aac gat tcc gat gag tac atc gca ttc ttg ggc	811
	Pro Pro Ala Glu Ala Asn Asp Ser Asp Glu Tyr Ile Ala Phe Leu Gly	
	180 185 190 195	
25	atg ctg cgt gag gtt ctt gct gca gag cct ggc aag tgg ggc aag atc	859
	Met Leu Arg Glu Val Leu Ala Ala Glu Pro Gly Lys Trp Gly Lys Ile	
	200 205 210	
30	gct gag gcc gtt aag ggt gtc acc gag gaa acc acc acc ggt gtg cac	907
	Ala Glu Ala Val Lys Gly Val Thr Glu Glu Thr Thr Thr Gly Val His	
	215 220 225	
35	cgc ctg tac cac ttc gct gaa gaa ggc gtg ctg cct ttc cca gcg atg	955
	Arg Leu Tyr His Phe Ala Glu Glu Gly Val Leu Pro Phe Pro Ala Met	
	230 235 240	
40	aac gtc aac gac gct gtc acc aag tcc aag ttt gat aac aag tac ggc	1003
	Asn Val Asn Asp Ala Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn Lys Tyr Gly	
	245 250 255	
	acc cgc cac tcc ctg atc gac ggc atc aac cgc gcc act gac atg ctc	1051
	Thr Arg His Ser Leu Ile Asp Gly Ile Asn Arg Ala Thr Asp Met Leu	
	260 265 270 275	
45	atg ggc ggc aag aac gtg ctt gtc tgc ggt tac ggc gat gtc ggc aag	1099
	Met Gly Gly Lys Asn Val Leu Val Cys Gly Tyr Gly Asp Val Gly Lys	
	280 285 290	
50	ggc tgc gct gag gct ttc gac ggc cag ggc gct cgc gtc aag gtc acc	1147
	Gly Cys Ala Glu Ala Phe Asp Gly Gln Gly Ala Arg Val Lys Val Thr	
	295 300 305	
55	gaa gct gac cca atc aac gct ctt cag gct ctg atg gat ggc tac tct	1195
	Glu Ala Asp Pro Ile Asn Ala Leu Gln Ala Leu Met Asp Gly Tyr Ser	
	310 315 320	
	gtg gtc acc gtt gat gag gcc atc gag gac gcc gac atc gtg atc acc	1243
	Val Val Thr Val Asp Glu Ala Ile Glu Asp Ala Asp Ile Val Ile Thr	
	325 330 335	



	gcg acc ggc aac aag gac atc att tcc ttc gag cag atg ctc aag atg	1291
	Ala Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Ser Phe Glu Gln Met Leu Lys Met	
5	340 345 350 355	
	aag gat cac gct ctg ctg ggc aac atc ggt cac ttt gat aat gag atc	1339
	Lys Asp His Ala Leu Leu Gly Asn Ile Gly His Phe Asp Asn Glu Ile	
	360 365 370	
10	gat atg cat tcc ctg ttg cac cgc gac gac gtc acc cgc acc acg atc	1387
	Asp Met His Ser Leu Leu His Arg Asp Asp Val Thr Arg Thr Thr Ile	
	375 380 385	
15	aag cca cag gtc gac gag ttc acc ttc tcc acc ggt cgc tcc atc atc	1435
	Lys Pro Gln Val Asp Glu Phe Thr Phe Ser Thr Gly Arg Ser Ile Ile	
	390 395 400	
20	gtc ctg tcc gaa ggt cgc ctg ttg aac ctt ggc aac gcc acc gga cac	1483
	Val Leu Ser Glu Gly Arg Leu Leu Asn Leu Gly Asn Ala Thr Gly His	
	405 410 415	
25	cca tca ttt gtc atg tcc aac tct ttc gcc gat cag acc att gcg cag	1531
	Pro Ser Phe Val Met Ser Asn Ser Phe Ala Asp Gln Thr Ile Ala Gln	
	420 425 430 435	
	atc gaa ctg ttc caa aac gaa gga cag tac gag aac gag gtc tac cgt	1579
	Ile Glu Leu Phe Gln Asn Glu Gly Gln Tyr Glu Asn Glu Val Tyr Arg	
	440 445 450	
30	ctg cct aag gtt ctc gac gaa aag gtg gca cgc atc cac gtt gag gct	1627
	Leu Pro Lys Val Leu Asp Glu Lys Val Ala Arg Ile His Val Glu Ala	
	455 460 465	
35	ctc ggc ggt cag ctc acc gaa ctg acc aag gag cag gct gag tac atc	1675
	Leu Gly Gly Gln Leu Thr Glu Leu Thr Lys Glu Gln Ala Glu Tyr Ile	
	470 475 480	
40	ggc gtt gac gtt gca ggc cca ttc aag ccg gag cac tac cgc tac	1720
	Gly Val Asp Val Ala Gly Pro Phe Lys Pro Glu His Tyr Arg Tyr	
	485 490 495	
45	taatgattgt cagcattgag ggaatcgacg gcgccggcaa aaacaccctg gtttcggcat	1780
	taacgcaggt tattgatgca aaagtccttg cattcccacg ttatgaaacc tcgattcacg	1840
	cccaattggc cgcggaagca ctccacggcc gcatgggcca cctcaccgac agcgcctacg	1900
	ccatggccac gcttttcgcc ctcgaccgcc acttcgcga	1939
50	<210> 2	
	<211> 498	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
55	<400> 2	
	Met Val Arg Val Lys Lys Val Phe Leu Ile Phe Ile Phe Leu Lys Gly	
	1 5 10 15	

Ala Arg Gln Asp Met Ala Gln Val Met Asp Phe Lys Val Ala Asp Leu  
20 25 30

5 Ser Leu Ala Glu Ala Gly Arg His Gln Ile Arg Leu Ala Glu Tyr Glu  
35 40 45

Met Pro Gly Leu Met Gln Leu Arg Lys Glu Phe Ala Asp Glu Gln Pro  
50 55 60

10 Leu Lys Gly Ala Arg Ile Ala Gly Ser Ile His Met Thr Val Gln Thr  
65 70 75 80

Ala Val Leu Ile Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu Val Arg Trp  
85 90 95

15 Ala Ser Cys Asn Ile Phe Ser Thr Gln Asp Glu Ala Ala Ala Ala Ile  
100 105 110

Val Val Gly Ser Gly Thr Val Glu Glu Pro Ala Gly Val Pro Val Phe  
115 120 125

20 Ala Trp Lys Gly Glu Ser Leu Glu Glu Tyr Trp Trp Cys Ile Asn Gln  
130 135 140

25 Ile Phe Ser Trp Gly Asp Glu Leu Pro Asn Met Ile Leu Asp Asp Gly  
145 150 155 160

Gly Asp Ala Thr Met Ala Val Ile Arg Gly Arg Glu Tyr Glu Gln Ala  
165 170 175

30 Gly Leu Val Pro Pro Ala Glu Ala Asn Asp Ser Asp Glu Tyr Ile Ala  
180 185 190

35 Phe Leu Gly Met Leu Arg Glu Val Leu Ala Ala Glu Pro Gly Lys Trp  
195 200 205

Gly Lys Ile Ala Glu Ala Val Lys Gly Val Thr Glu Glu Thr Thr Thr  
210 215 220

40 Gly Val His Arg Leu Tyr His Phe Ala Glu Glu Gly Val Leu Pro Phe  
225 230 235 240

Pro Ala Met Asn Val Asn Asp Ala Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn  
245 250 255

45 Lys Tyr Gly Thr Arg His Ser Leu Ile Asp Gly Ile Asn Arg Ala Thr  
260 265 270

50 Asp Met Leu Met Gly Gly Lys Asn Val Leu Val Cys Gly Tyr Gly Asp  
275 280 285

Val Gly Lys Gly Cys Ala Glu Ala Phe Asp Gly Gln Gly Ala Arg Val  
290 295 300

55 Lys Val Thr Glu Ala Asp Pro Ile Asn Ala Leu Gln Ala Leu Met Asp  
305 310 315 320

Gly Tyr Ser Val Val Thr Val Asp Glu Ala Ile Glu Asp Ala Asp Ile  
325 330 335

Val Ile Thr Ala Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Ser Phe Glu Gln Met  
 340 345 350  
 5 Leu Lys Met Lys Asp His Ala Leu Leu Gly Asn Ile Gly His Phe Asp  
 355 360 365  
 Asn Glu Ile Asp Met His Ser Leu Leu His Arg Asp Asp Val Thr Arg  
 370 375 380  
 10 Thr Thr Ile Lys Pro Gln Val Asp Glu Phe Thr Phe Ser Thr Gly Arg  
 385 390 395 400  
 15 Ser Ile Ile Val Leu Ser Glu Gly Arg Leu Leu Asn Leu Gly Asn Ala  
 405 410 415  
 Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Asn Ser Phe Ala Asp Gln Thr  
 420 425 430  
 20 Ile Ala Gln Ile Glu Leu Phe Gln Asn Glu Gly Gln Tyr Glu Asn Glu  
 435 440 445  
 Val Tyr Arg Leu Pro Lys Val Leu Asp Glu Lys Val Ala Arg Ile His  
 450 455 460  
 25 Val Glu Ala Leu Gly Gly Gln Leu Thr Glu Leu Thr Lys Glu Gln Ala  
 465 470 475 480  
 30 Glu Tyr Ile Gly Val Asp Val Ala Gly Pro Phe Lys Pro Glu His Tyr  
 485 490 495  
 Arg Tyr

35

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine für das sahH-Gen kodierende  
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID  
No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c)

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der  
20 Adenosylhomocysteinase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
5 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,  
und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung  
10 unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC  
durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein  
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das sahH-Gen verstärkt,  
insbesondere überexprimiert wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man  
20 folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
zumindest das sahH-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
25 überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den  
Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
30 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien

einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das sahH-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sahH kodiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
  - 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
  - 30 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
  - 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,
  - 5 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
  - 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
  - 10 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
  - 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
  - 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
  - 15 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
  - 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
  - 20 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
  - 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
  - 25 15.14 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal
- verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen

fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,
- 5 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi*,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*  
abschwächt.
- 10 17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 15 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die Adenosylhomocysteinase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *sahH*-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungs sonden einsetzt.
- 20



### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sahH-Gen verstärkt vorliegt, und die  
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.